

**העלאת יבול השזיף היפני בישראל
ע"י אפיון ההתאמה הגנטית בין מפרים למופרים
באמצעות כלים מולקולריים**

**Increasing yield of Japanese plum in Israel by
determining genetic fit between male and female
varieties by molecular techniques**

דו"ח מסכם לשנים 2001-2003

קוד מס' 596-0204-01

מוגש ע"י:

רפי שטרן, מרטין גולדווי, דן איזיקוביץ', יעל גרינבלט, גל ספיר

דצמבר 2003

תקציר

השזיף היפני שייך למשפחת הוורדיים וקיימת בו, כמו בהרבה וורדיים אחרים, תופעת אי התאם עצמי. חלק ניכר מזני השזיף היפני ובמיוחד האיכותיים שבהם, סובל מבעיה חמורה של פוריות לקויה. כתוצאה מכך, העצים אינם מממשים את מלוא פוטנציאל היבול ולכן הכנסות החקלאים בענף זה נמוכות. מבין הגורמים הרבים בעלי ההשפעה על יבולי מטעים, התאמה גנטית היא תנאי הכרחי להפריה טובה אבל פרמטרים נוספים כמו: התאמת מועדי הפריחה, חיוניות גרגרי אבקה וכן האבקה יעילה משפיעים אף הם על הפוריות. מתוך הניסיון שצברנו בהבנת מערכת ההאבקה וההפריה בתפוחי עץ, בקשנו לשפר תהליכים אלו ע"י אפיון התבנית הגנטית של אללי S ממנגון אי ההתאם העצמי בשלושה זני שזיף שונים. על ידי כך קיוונו להמליץ על התאמה טובה יותר בין זנים מופרים לזנים מפרים.

מסיכום תוצאות שלוש שנות המחקר עולה כי יש הבדל משמעותי בין שני המפרים (Wickson=W) ו-Royal Zee=RZ) של ה-Red Beaut=RB. נמצא כי הזן-W מעניק חנטה גבוהה יותר ל-RB. עם זאת נמצא שההבדל איננו נובע מאי התאם גנטי, אלא דווקא מאופי התנהגות הדבורים על פרחי שלושת הזנים.

כמו כן מצאנו כי הזן RB מכיל גרגרי אבקה פגומים ועקרים, ועל-כן – לא רק שהוא עקר לעצמו, אלא הוא עקר לכל שאר הזנים.

בבדיקת התאמה גנטית שערכנו בזני שזיף נוספים זוהו אללים חדשים, ונמצא כי יש בעיה של אי התאם גנטי חלקי בין זנים שונים. כך למשל הבלק-דאימונד(BD) והאנגילינו (AN) הם בעלי התאם חלקי בלבד עם RZ: לראשון – אלל S₅ משותף עם RZ ולשני אלל S₄ משותף עם RZ. בבדיקה ראשונית של הכפלת מספר הכוורות או הצבתן בדירוג לשיפור פעילות הדבורים על עצי הזן BD מצאנו כי שתי השיטות הביאו להגדלה ניכרת בשיעורי החנטה והיבול.

רשימת פרסומים

Sapir, G., Stern, R.A., Eisikowitch, D. and Goldway, M. (2003). Cloning of four new Japanese plum S-alleles and determination of the compatibility between cultivars by PCR analysis. J. Hort. Sci. and Biotech. (in press)

ספיר ג., שטרן ר., שניידר ד., זיסוביץ ע., מתיתיהו א., גולדווי מ., איזיקוביץ ד., גרינבלט י.,
אנטמן ש. (2002). שימוש בשיטות מולקולריות לאפיון התאמה גנטית בין זנים של שזיף יפני. עלון
הנוטע 56 : 313-312.

ספיר ג., שטרן ר., שניידר ד., זיסוביץ ע., מתיתיהו א., גולדווי מ., איזיקוביץ ד., גרינבלט י.,
אנטמן ש. (2002). בעיות הפוריות בשזיף יפני 'רד-ביוט' נובעות מפעילות דבורים נמוכה. עלון
הנוטע 56 : 315-314.

מבוא ותאור הבעיה

השזיף היפני מהווה מקור הכנסה חשוב לחקלאים רבים. עם זאת רווחיותו בשנים האחרונות, נמצאת בירידה מתמדת עקב פוריות לקויה. אחד הגורמים לפוריות הנמוכה קשור ככל הנראה לשעורי האבקה נמוכים, או לתקלות שונות בתהליכי ההפריה. ממצאים הקדמיים שלנו בענף התפוח, שסובל אף הוא מבעיה דומה, הראו כי ניתן להעלות את רמת היבולים בעשרות אחוזים בשיטה פשוטה: על ידי העלאת שיעורי ההאבקה וההפריה ומציאת מפרה מתאים. המחקר שביצענו בחן את האפשרות של העלאת היבולים ע"י איפיון הזנים המאביקים המתאימים ביותר לזנים העיקריים.

מטרות המחקר

ניסינו למצוא קשר בין ההתאמה הגנטית של הזן המפרה והמופרה לבין רמות היבול. כמודל שימש הזן (RB) Red Beaut והזנים המפרים (W) Wickson ו-(RZ) Royal Zee, אך בשנה השלישית הרחבנו את בדיקת ההתאמה הגנטית גם לזני שזיף נוספים.

מטרות המשנה להשגת יעד זה הן:

1. אפיון אללי S של זני השזיף השונים ברמה מולקולרית.
2. פיתוח טכניקת עבודה לאנליזה של אללי S באמצעות PCR.
3. קביעת פוטנציאל ההפריה של הזנים המפרים W ו-RZ ובחינתם במטע ע"י האבקה טבעית(פתוחה) וידנית.
4. בחינת ההיפותזה של מגבלת האבקה זרה במטע, הגורמת ליבולים נמוכים, וניסיון להגברתה ע"י תוספת כוורות במטע או הצבתן בדירוג.

חומרים ושיטות

א. בחינת יעילות מפרים לאחר האבקה טבעית במטע

בשלב הראשון של המחקר בחנו זן מסחרי חשוב בעל אי התאם עצמי מלא: RB ושני מפרים סטנדרטיים שלו: W ו-RZ. עקבנו אחר פוריות עצי RB הסמוכים למפרים השונים. בחינת הפוריות במטע נעשתה על ידי מעקב אחר החנטה וגובה היבול. מעקב החנטה בוצע על ידי סימון 4000 פרחים לטיפול (100 פרחים לענף 4 X ענפים לעץ 10 X עצים), במטע של חוות המטעים בעמק החולה.

המדדים שנבדקו:

- א. רישום סדרי הפריחה של כל זן.
- ב. אחוז החנטה בענפים מסומנים (סוף אפריל).
- ג. יבול לעץ - כל אחד מ-10 העצים לטיפול נקטף ונשקל בנפרד.

ב. בידוד אללי S

אפיון אללי S באמצעות PCR מתבסס על הכרת רצף ה-DNA של כל אלל ואלל. על בסיס ההבדלים בין רצפי האללים השונים ניתן לייצר עבורם תחלים יחודיים. באמצעות תחלים אלה ניתן לערוך אנליזה לאפיון האללים בזנים השונים. אללי ה-S של שזיפים טרם בודדו עד כה. על פי עבודות בורדיים אחרים וסולניים צפוי שימצא דימיון בין אללי S של שזיף ואללי S שכבר אופיינו. על פי המידע הקיים ניתן לזהות בקרב אללי S שונים רצפים שמורים ורצפים משתנים. הרצפים השמורים יכולים לשמש כאזור שעבורו נסנטז תחלים ל-PCR שבאמצעותם נבודד מיקטעים פנימיים מתוך רצפי אללי S של שזיפים. במהלך המחקר ניקבע רצף המקטעים, ועל פיו ייצרנו תחלים יחודיים לכל אלל ואלל. תחלים ייחודיים אלה שמשו לאנליזה ולאפיון ספציפי של זני השזיף.

ג. אפיון ההורה המאביק

באמצעות אנליזה של אללי S ניתן גם לקבוע מי מבין הזנים במטע הפרה את הפרח. לשם כך נערכה בדיקת אבהות של הצאצאים שהונבטו מזן השזיף האמהי RB. הזרעים הוכנסו מיד לאחר הקטף להכמנה ב-0°C למשך 6 חודשים. לאחר ההכמנה הונבטו הזרעים ב-25°C ומהעלים הראשונים הופק DNA. על גבי ה-DNA התבצעה אנליזה של אללי S. צפוי כי מבין שני אללי S המצויים בנבט, אחד יהיה ממקור אמהי של הזן המופרה (RB), והאחר יהיה ממקור אבהי של הזן המופרה (W או RZ). יחד עם זאת יתכן כי ההאבקה תתבצע גם ע"י מאביקים רחוקים פיזית מה-RB (שונים מה-W וה-RZ) ואת שיעורי ההאבקה הזו נוכל לאתר באמצעות אנליזת ה-PCR.

ד. איפיון פוטנציאל ההאבקה של ההורה המאביק

גם כאשר מתרחשת האבקה, הצלחתה עשויה להיות מלאה או חלקית. ניתן לאתר את אופי ההפריה על ידי זיהוי התפלגות אללי S בקרב הצאצאים מחד ועל ידי איפיון רמות החנטה והיבול מאידך. כך למשל בהפריה מלאה שמקורה בהתאם מלא ימצאו אללי ה-S האבהיים בהתפלגות שווה של 50% בקרב כל אחד מהצאצאים. לעומת זאת בהפריה של התאם חלקי שבו נדחה אלל אחד ורק השני מפרה ימצא בקרב הצאצאים רק אלל אבהי אחד (100% מכלל הצאצאים). הפריה חלקית זו עלולה להתבטא גם בפחיתה בחנטה וביבול.

ה. פעילות דבורים

כוורות דבורי-דבש (*Apis mellifera*) שמקור המלכות מהוואי, ארה"ב הוצבו ע"י מכוורת נאות מרדכי במטע של חוות המטעים בחולה, בצפיפות של כוורת אחת לכל 4 דונם, כמקובל במטעים מסחריים. פעילות הדבורים נבדקה בעצים אחידים מבחינת גיל הפרחים, שלבי הפריחה ועוצמתה.

1. קביעת האטרקטיביות לדבורים לאורך עונת הפריחה

הבדיקה נערכה בעץ אקראי בכל זן. ספירת ביקורי הדבורים בפרחי העץ בפרק זמן של דקה בוצעה ע"י בודק יחיד הנמצא במרחק מעץ בו ניתן להבחין בכל ביקורי הדבורים. לכל זן בוצעו 3 חזרות לסירוגין. הבדיקה בוצעה מידי יום בשעה קבועה (10:00) לכל אורך עונת הפריחה.

2. אפיון פעילות הדבורים

הבדיקה נערכה תוך כדי הליכה לאורך שורת הזן הנבדק. נספרו דבורים אוספות צוף ואוספות אבקה. הבדיקה הסתיימה כאשר נספרו 50 דבורים אוספות צוף או אבקה, או כאשר זמן הבדיקה התארך מעל 15 דקות. הבדיקה נערכה ב 3 חזרות לכל זן. מתוך ממצאי הבדיקה חושב אחוז הדבורים אוספות הצוף ו/או האבקה מכלל הדבורים.

3. מעבר הדבורים במטע

נבדקו שלושה סוגי מעברים של דבורים: מעבר בין שני עצים סמוכים בשורה (אותו זן), מעבר בין שתי שורות עצים סמוכות מאותו זן (בזן 'Red-Beaut'), מעבר בין שתי שורות עצים סמוכות מזנים שונים (מעבר בין מאביק למואבק ולהפך). בכל סוג מעבר נספרו הדבורים שנצפו עוברות במשך דקה מעץ אחד לעץ אחר.

4. בדיקת הרכב סוכרים בצוף

לפרחים שכויסו 24 שעות קודם לבדיקה, הוחדרה קפילרה של ($1 \mu\text{l}$) לאזור הצופנים בבסיס הפרח ודגימה של $3 \mu\text{l}$ צוף נאספה מבלי לנתק את הפרח מהעץ. הדגימות נשמרו עד לבדיקה ב- $300 \mu\text{l}$ מים מזוקקים ב- 20°C הרכב הסוכרים בצוף נקבע בשיטת HPLC עם אינדיקטור RI וקולונת (Bio-Rad) HPX-87H Aminex ($300 \times 7.6\text{mm}$). אלוציה של דוגמא בנפח $20 \mu\text{l}$, התבצעה בעזרת

Retention time של $0.8 \text{ ml X min}^{-1}$. זיהוי הסוכרים נעשה לפי H_2SO_4 0.005 M בקצב של $0.8 \text{ ml X min}^{-1}$. זיהוי הסוכרים נעשה לפי Retention time של סטנדרטים של סוכרים ידועים.

5. בדיקת חיוניות האבקה

שעור הנביטה

אבקנים מחמישה פרחים הועברו ל-1 ml תמיסת הנבטה, שהכילה: 10% סוכרוז, $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ חומצה בורית (H_3BO_3) ו- $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ סידן חנקתי [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]. התערובת עורבבה היטב ודוגמאות של $200 \mu\text{m}$ ממנה (שהכילו רק תמיסת הנבטה וגרגרי אבקה, ללא שאריות מאבקים) הועברו לבאריות בצלחת אלייזה, והודגרו במשך שעה בטמפרטורת החדר. באמצעות מיקרוסקופ אור זוהו גרגרי אבקה שנבטו ואשר להם הנחשון ארוך מגרגר האבקה. שיעור הנביטה נקבע על פי מספר גרגרי אבקה שנבטו מכלל גרגרי האבקה.

צורת גרגרי האבקה

גרגרי אבקה קובעו בתמיסת (FAA) Formalin+ Acetic Acid ויובשו בעזרת סדרת תמיסות בריכוזים עולים של אתנול. גרגרי האבקה צופו בשכבה דקה של זהב, ונסרקו במיקרוסקופ אלקטרוניים סורק מסוג GEOL 840L (Rabinowitch et al., 1993), במחלקה לבוטניקה שבאוניברסיטת תל-אביב.

1. הכפלת מספר הכוורות במטע או הצבתן בדירוג להגברת פעילות הדבורים

ניסוי הקדמי לבחינת הרעיון של הגברת פעילות הדבורים במטע, שתביא לשיפור ההאבקה הזרה ולהעלאת יבולים, נערך במטע השזיף של כפר בלום על הזן "בלק-דאימונד" באביב 2003. במטע שאורכו 700 מ' הוכנסו בצד הצפוני כוורות בצפיפות כפולה מהמקובל במטעים, כלומר ביחס של 2:1 (כוורת אחת לשני דונם), בהשוואה ליחס הסטנדרטי של 1:4 (כוורת אחת לארבעה דונם = ביקורת). כל הכוורות, הן של הטיפול הצפוף והן של הביקורת, הוכנסו בתחילת פריחה. בחלק הדרומי של החלקה הוכנסו הכוורות ביחס הסופי המקובל של 1:4 אך בדירוג, כלומר – 50% בתחילת פריחה (יחס כוורות ראשוני של 1:8) ו-50% לקראת שיא הפריחה (השלמה ליחס כוורות סופי של 1:4). כל זאת בהשוואה להצבה חד-פעמית בתחילת הפריחה (1:4 = ביקורת, שהיא משותפת גם לטיפול הצפוף).

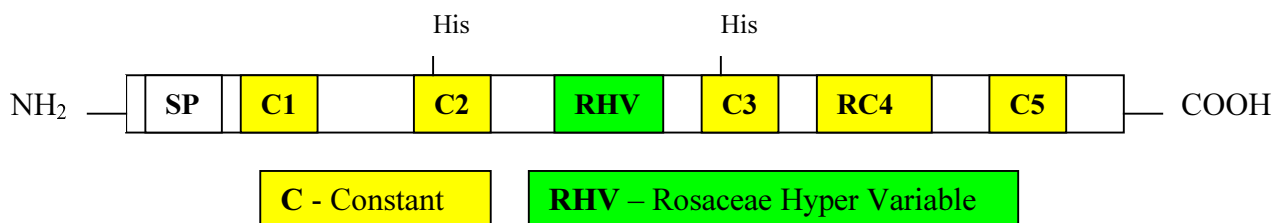
מעקב אחר פוריות העצים נערך ע"י סקר חנטה ורישום יבולים.

בכל אחד משלושת הטיפולים (ביקורת, צפוף, מדורג) סומנו 2000 פרחי "בלק-דאימונד" (100 פרחים לענף $2 \times$ ענפים לעץ $10 \times$ עצים). העצים המסומנים היו במרחק של כ-50 מ' מהכוורת. כחודש לאחר הפריחה נבדקו אחוזי החנטה ובקטיף נרשם היבול לעץ.

תוצאות

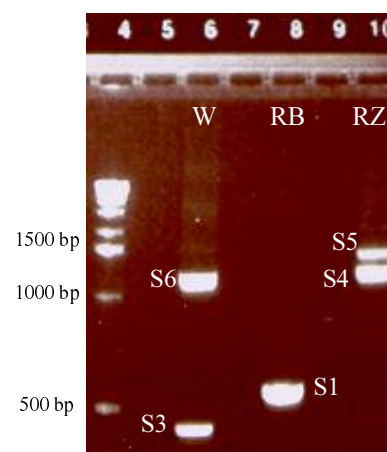
1. שיבוט מקטעים חלקיים של אללי S

S-RNase הינו הדטרמיננטה הנקבית הפועלת במנגנון אי ההתאם העצמי הגמטופיטי. זהו החלבון הראשון שזוהה כחלק מהמנגנון, והוא מקיים את הכלל הצפוי מגנים הפועלים במנגנון – רמה גבוהה של שונות אללית. שונות זאת המתבטאת בעיקר באזור המשתנה - RHV, האחראי ככל הנראה על הספציפיות של כל אחד מהאללים. מבנה החלבון מאופיין גם ע"י חמישה אזורים שמורים (איור 1). *S*-RNase הינו חלק מלוקוס *S* וכל אלל מייצג את ההפלוטיפיות של הלוקוס *S* כולו. האזורים השמורים בחלבון נוצלו לתכנון פריימרים אוניברסליים, עבור PCR שבעקבותיו שובטו מקטעים מתוך האללים ונקבע ריצפם. הפריימרים האוניברסלים ששמשו בעבודה הפריימרים Pru-C2 ו Pru-C4R שהינם הומולוגים לאזורים C2 ו RC4 בהתאמה.



איור 1 – מבנה סכמטי של *S*-RNase מורדיים. C1-5 - אזורים שמורים, RHV - אזור משתנה. ב RHV ממוקם האינטרון, ב C2 וב C3 פעילות ה-RNase. SP - Signal Peptide.

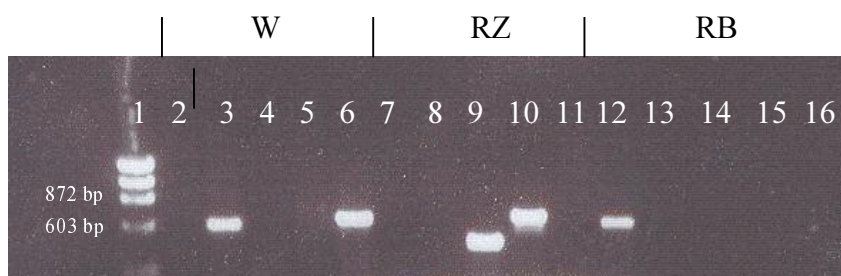
ה-PCR שנערך ל DNA גנומי של הזנים 'Red-Beaut' (RB), 'Wickson' (W) ו 'Royal-Zee' (RZ) העלה חמישה תוצרים: שניים מהזנים 'Wickson' (סומנו S3, S6) ו 'Royal-Zee' (סומנו S4, S5) ואחד מהזן 'Red-Beaut' (סומן S1) (תמונה 2).



תמונה 2 – הרצת תוצרי PCR עם הפריימרים האוניברסליים Pru-C2 ו Pru-C4R בגיל אגרוז 2%. ערוץ 4 – סמן גודל 1 Kb. ערוץ 6 – תוצרי PCR מהזן 'Wickson'. ערוץ 8 – תוצרי PCR מהזן 'Red-Beaut'. ערוץ 10 – תוצרי PCR מהזן 'Royal-Zee'.

2. פיתוח אנליזה ספציפית לבחינת אללי S

הקטע שרוצף מתוך אללי ה-S של השזיף כולל אינטרון. מכיוון שהאינטרון אינו מתורגם לחלבון, הוא עשוי לצבור מוטציות בשיעור גבוה מזה של האקסון. מוטציות אלו יכולות להיות מוטציות חסר/הוספה, הגורמות לשונות באורכו הכללי של האלל או מוטציות החלפה נקודתיות הגורמות לשוני ברצף ה-DNA. סוג המוטציות השני נוצל לסטוז פריימרים ספציפיים עבור כל אחד מהאללים. לאיתור האלל S1 מהזן 'Red-Beaut' שימשו הפריימרים IB2 ו A6. לאיתור האלל S3 מהזן 'Wickson' שימשו הפריימרים IW5 ו A5. לאיתור האלל S4 מהזן 'Royal-Zee' שימשו הפריימרים IZ1 ו IZ4. לאיתור האלל S5 מהזן 'Royal-Zee' שימשו הפריימרים IZ2 ו IZ5. לאיתור האלל S6 מהזן 'Wickson' שימשו הפריימרים IW2 ו Pru-C2. כביקורת נערך גם PCR של כל אחד מזוגות הפריימרים הספציפיים עם DNA גנומי של שלושת הזנים.



תמונה 3 – ריאקציית PCR של חמשת האללים מול DNA גנומי משלושת הזנים. ערוץ 1 – סמן גודל Φ x174/Hea III. ערוצים 2-6 – DNA גנומי מהזן 'Wickson' עם פריימרים עבור האללים S1-S6 בהתאמה. ערוצים 7-11 – DNA גנומי מהזן 'Royal-Zee' עם פריימרים עבור האללים S1-S6 בהתאמה. ערוצים 12-16 – DNA גנומי מהזן 'Red-Beaut' עם פריימרים עבור האללים S1-S6 בהתאמה.

מתמונה 3 אפשר לראות כי הזן 'Wickson' מגיב (יש תוצר) עם הפריימרים הספציפיים ל S3 ו S6 ואינו מגיב כאשר הפריימרים ספציפיים לאללים אחרים. באותו אופן יש תגובה בזן 'Royal Zee' רק לצמדי הפריימרים ל S4 ו S5 ובזן 'Red Beaut' לפריימרים של S1.

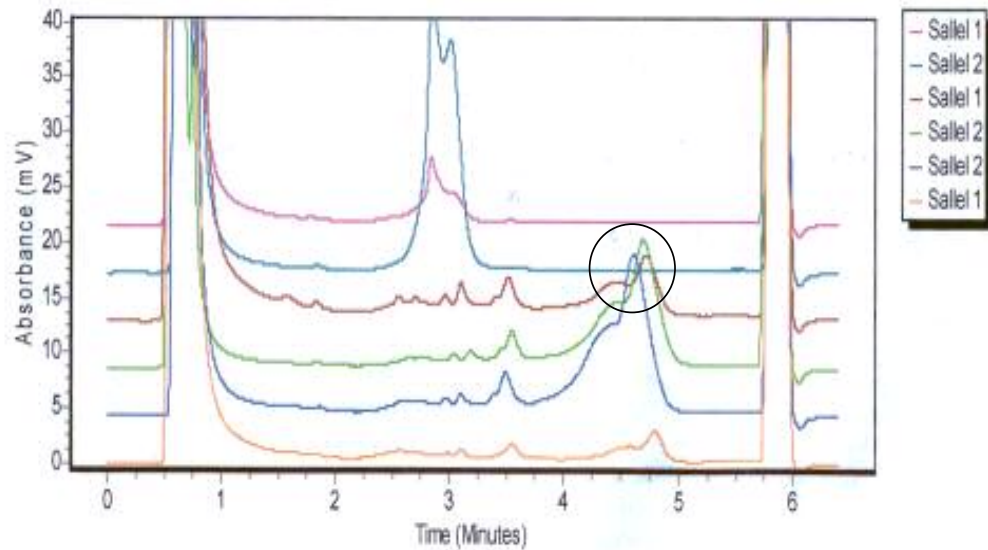
3. אלל נוסף ב 'Red Beaut'

מכיוון שהצלחנו לשבט רק אלל אחד מהזן 'Red Beaut' (S1), נקטנו במספר גישות במטרה למצוא את האלל השני או לקבוע האם קיים אלל בודד.

גישה 1: ביצוע PCR עם שילובי פריימרים אוניברסליים נוספים אשר התאימו לכל אחד מחמשת האזורים השמורים של החלבון. תוצאות ההרצה בגיל היו תמיד תוצר אחד בלבד. שיבוט המקטעים ופענוח הרצף לחלקם לא העלה אלל אחר מלבד S1.

גישה 2: במטרה לבדוק האם בתוצר PCR עם הפריימרים האוניברסליים, קיימים שני תוצרי PCR שונים, השתמשנו באנליזה של DHPLC. מכשיר זה אשר מפריד מולקולות DNA בקולונה קושרת DNA מסוגל להבדיל בתערובת של שני רצפים אפילו אם הם שונים רק בנוקלאוטיד אחד בודד

בבקטע של כ – 500 bp). במכשיר הורץ תוצר ה PCR (עם הפריימרים האוניברסליים Pru-1 ו Pru-C2 (הגנומי S1) (allele-S1), מול קלון של S1 (allele-S2) (תמונה 4).

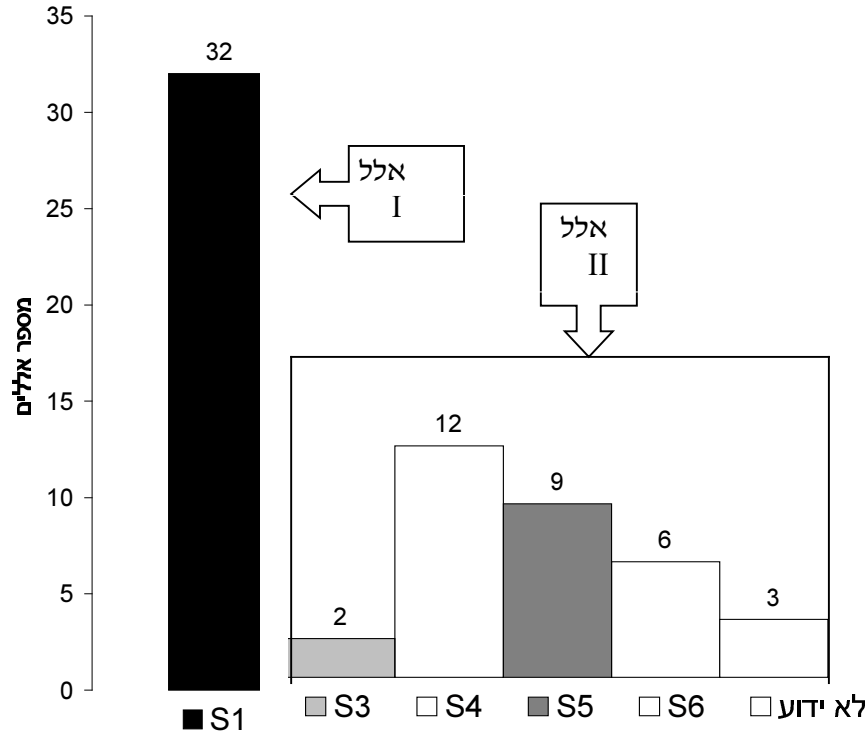


תמונה 4 – הרצת תוצר PCR מפריימרים אוניברסליים של הזן 'Red Beut' מול קלון של S1 אשר בודד מתוך 'Red Beut'.

בתמונה 4 מוצגות מספר הזרקות של דוגמאות במכשיר ה DHPLC. ההרצות הרלוונטיות סומנו בעיגול. מאחר ודגם הפיק, עוצמתו ומיקומו אחידים בין תוצר ה PCR הגנומי לבין תוצר ה PCR של הקלון המשובט המכיל רק הומודופלקסים, אפשר לקבוע כי גם תוצר ה PCR הגנומי הוא אחיד, ואין בו הטרו אלליות.

גישה 3 : בחינת התפלגות אלל S1 בקרב צאצאי 'Red Beut'. בחינה שניה של האלל הנוסף בזן 'Red Beut' בוצעה לאחר הנבטת צאצאים של הזן. ההנחה היתה כי אם קיים אלל נוסף רק מחצית מהצאצאים ישאו את S1. בחינה זאת מבוצעת ע"י אנליזה של אללי S עם פריימרים ספציפיים לאחר הנבטת הזרעים ומיצוי DNA מעלים ראשונים של הצימחון. האנליזה בוצעה ע"י אפיון האללים בפריימרים ספציפיים של 32 צימחונים (גרף 1).

פיזור אללים בצאצאים



גרף 1 – התפלגות האללים ב 32 צמחונים מזרעים של הזן 'Red-Beaut'. לכל צמחון 2 אללים (סה"כ 64), אשר אופיינו ע"י אנליזה של פריימרים ספציפיים.

מתוך האנליזה עולה כי בכל הצמחונים קיים אלל S1, שמקורו ככל הנראה בזן המופרה 'Red-Beaut', שאר האללים מתפלגים באופן שווה יחסית בין ארבעת האללים הידועים של המפרים. תוצאה זאת, עומדת גם היא עם הסברה כי לזן 'Red-Beaut' רק אלל אחד שהינו S1.

4. יישום אנליזת אללי S לבדיקת התאמה בין זני שזיף

האנליזה הספציפית של אללי S, מאפשרת אפיון אללים ישירות מ DNA גנומי של כל זן נבדק. כך, ניתן למצוא אי התאמה אללית בין זנים, העלולה להוביל לתופעה של פחיתה ביבולים עקב מנגנון אי ההתאם העצמי. במהלך העבודה, בוצעה על פי בקשה של שה"ם (שירות הדרכה משרד החקלאות) אנליזה ספציפית לאללי S עבור מפרים פוטנציאליים ל 'Royal-Zee', בעקבות יבולים

נמוכים בזן זה במטעים אחדים. באנליזה נבחנו הזנים - 'Angeleno', 'Black-Diamond', ו-'Black-Gam' לנוכחות האללים S4 ו S5 המצויים ב 'Royal-Zee' (תמונה 5).



תמונה 5 – ריאקציית PCR ספציפית עם פריימרים ל S4 (IZ1+IZ4) ו S5 (IZ2 + IZ5) מול DNA גנומי של 'Black-Gam' (BG), 'Red-Beaut' (RB), 'Angeleno' (AN), 'Black-Diamond' (BD), ו-'Royal-Zee' (RZ).

מניתוח תוצאות ה PCR עולה כי לזן 'Black-Diamond' אלל S5 ולזן 'Angeleno' אלל S4. בזן 'Black-Gam' לא נמצא אף אחד מאותם שני אללים. מכך נובע ששני הזנים הראשונים הם בעלי התאם חלקי להפריית 'Royal-Zee' (50% מגרגרי האבקה שלהם ידחו בעמוד העלי) ואילו 'Black-Gam' הינו בעל התאם גנטי מלא להפריית 'Royal-Zee'.

טבלה 1. סיכום גרפי של התאמה גנטית בין זני השזיף השונים שנבדקו במהלך העבודה

התאם מלא =

התאם חלקי =

אבקה עקרה =

- Royal Zee = RZ
- Red Beaut = RB
- Black Diamond = BD
- Angeleno = AN
- Wickson = W
- Black Gam = BG

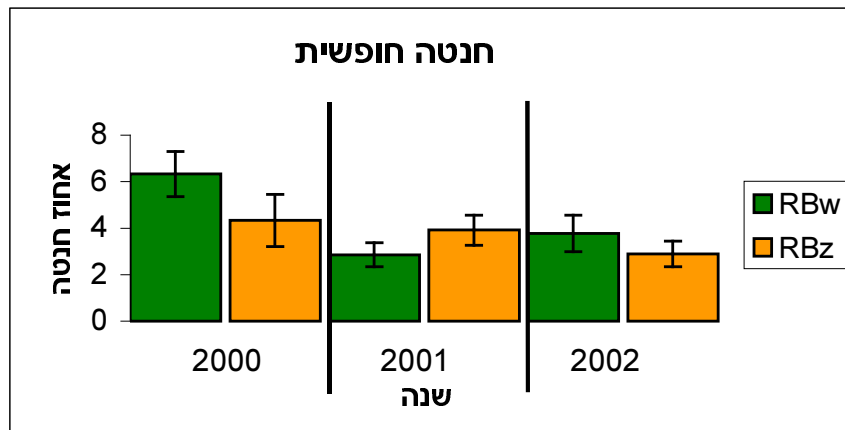
♀♂	RB	BD	AN	W	BG	RZ
RB						
BD						
AN						
W						
BG						
RZ						

5. חפיפת פריחה

תנאי מקדים והכרחי להפריה הינו חפיפת פריחה בין הזנים המייצגת חפיפה בבשלותם של הגמטות הנקביות (בביצית) בצמח המופרה והגמטות הזכריות (בגרגר אבקה) בצמח המפרה. התמונה המתקבלת מהגרפים של חפיפת הפריחה (לא מוצג) מצביעה על חפיפה מלאה בשתי העונות בין 'Royal Zee' ל'Red Beaut', בעוד הפריחה של הזן 'Wickson' התאחרה וחפפה חלקית בלבד את פריחת 'Red Beaut'. הפער בין שיאי הפריחה היה גדול יותר ב 2001 מאשר ב-2002. יש לציין כי החפיפה החלקית של 'Wickson' עם 'Red Beaut' הינה בעיה שעלתה כבר בשנים קודמות, ומשום כך, מטופל 'Wickson' בחומרים מקדימי פריחה (אלזודף + שמן חורפי).

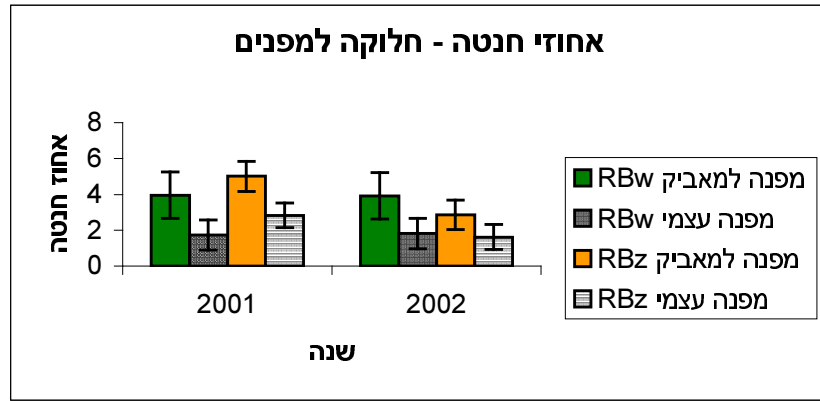
6. חנטה כתוצאה מהאבקה חופשית

אחוזי החנטה בהאבקה חופשית נבחנו ע"י מדידת החנטה בשורה הקרובה לכל מפרה. נתוני החנטה והייבול המובאים בעבודה הינם של הזן 'Red Beaut', וסומנו בגרפים כ - RBz לשורות הסמוכות ל 'Royal Zee' ו RBw לשורות הסמוכות ל'Wickson' (גרף 2 א'). חלוקה למפנים הינה חלוקת השורה לצד הפונה למפרה לעומת הזן הנגדי לו (כל שורת 'Red Beaut' סמוכה למפרה מחד ולשורה נוספת של 'Red Beaut' מאידך) (גרף 2 ב').



גרף 2 א' – אחוזי החנטה (\pm שגיאת התקן) בשורות ה RB לפי סמיכות המפרה.

ניתוח תוצאות החנטה מצביע על העובדה כי אחוזי החנטה בשורות הסמוכות ל'Wickson' גבוהים יותר מאלו הסמוכות ל 'Royal Zee'. לעומת האחידות באחוזי החנטה בשורות הסמוכות ל 'Royal Zee' בשתי העונות (בדומה לנתונים ההקדמיים), אחוזי החנטה בשורות 'Red Beaut' הסמוכות ל 'Wickson' נפגעו בשנת 2001 כתוצאה מחפיפת הפריחה הגרועה בין הזנים.

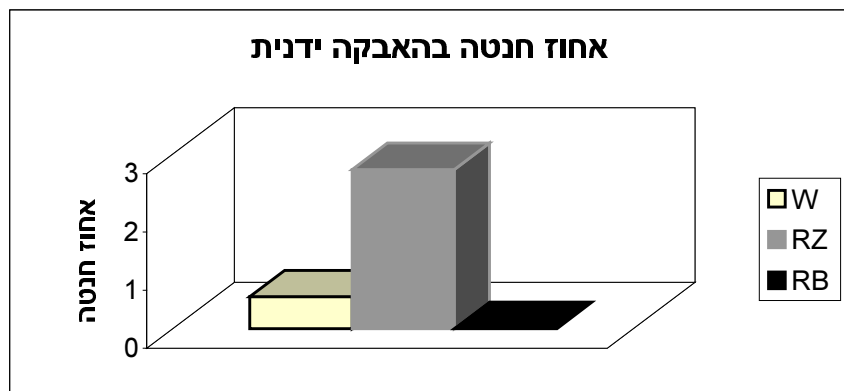


גרף 2 ב' – אחוזי החנטה (\pm SE) בזן 'Red Beaut' עפ"י חלוקה של השורה למפנה אל המפרה ולצד הנגדי הפונה לשורת 'Red Beaut' נוספת. שנים 2001 ו 2002.

חלוקת אחוזי החנטה על פי המפנה מצביעה על תופעה האופינית מאוד לפעילות דבורים נמוכה – הבדלים בין אחוזי החנטה בזן הפונה למפרה לעומת הצד הנגדי. נתונים אלו תואמים את האטרקטיביות הנמוכה של 'Red Beaut' לדבורים (גרף 4).

7. חנטה כתוצאה מהאבקות ידניות

האבקות ידניות נעשו במטרה לבדוק את מידת אי ההתאם העצמי של 'Red Beaut' ואת יעילות ההפריה של הזנים המפריים (גרף 3). הניסוי בוצע ע"י כיוס ענפים ברשתות למניעת כניסה של חרקים. בשיא פריחה הוסרו זמנית השקיות והצלקות הואבקו בעודף ע"י אבקת הזן הנבדק.



גרף 3 – אחוזי החנטה בזן RB לאחר האבקות ידניות.

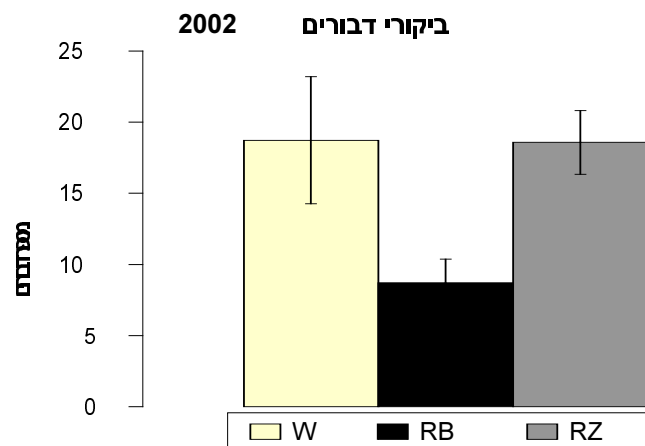
תוצאות ניסוי זה מצביעות על חוסר יכולתו המוחלטת של 'Red Beaut' להפרות את עצמו. מבחינת ההאבקה הזרה ל 'Red Beaut', עולה כי שעורי החנטה לאחר האבקה עם 'Royal Zee' היו גבוהים בהשוואה להאבקה עם 'Wickson' (2.73% ו 0.55% בהתאמה).

פעילות דבורים

פעילות הדבורים במטע נבחנה בשנתיים עוקבות (2001 + 2002). בשנת 2001 כתוצאה ממוזג אוויר בעייתי בימי התצפית שלא אפשר פעילות דבורים תקינה, נערכו תצפיות ביום אחד בלבד ונתונים אלו אינם מובאים. נתוני שנת 2002 נאספו במהלך כל עונת הפריחה והם מוצגים להלן.

8. אטרקטיביות הזנים לדבורים

אטרקטיביות הדבורים לעץ מתבטאת במספר ביקורי הדבורים בכל זן. הבדיקה נערכה מידי יום לכל אורך עונת הפריחה של שלושת הזנים בשעה קבועה (גרף 4).

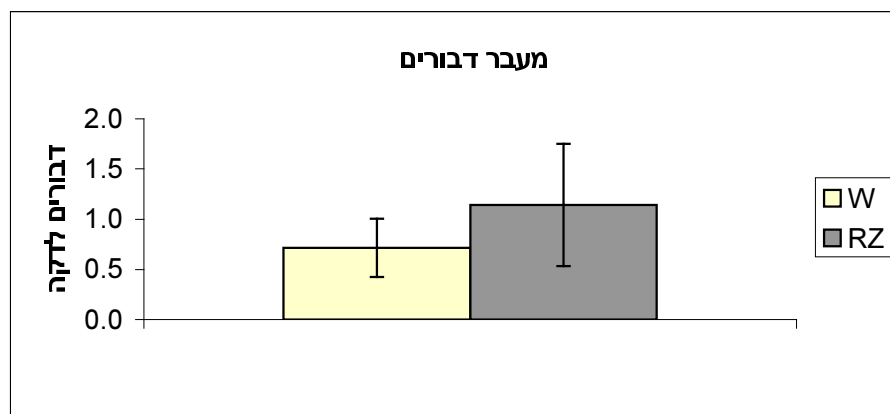


גרף 4 – מספר ביקורי הדבורים (ממוצע לדקה \pm SE) לאורך עונת הפריחה – שנת 2002.

נתוני משיכת הדבורים לזנים השונים מצביעים על אטרקטיביות דומה לשני הזנים המפריים 'Wickson' ו'Royal Zee' (כ - 19 ביקורים לדקה). לעומת זאת, ביקורי הדבורים ב'Red Beaut' פחותה בהרבה (כ - 9 ביקורים לדקה).

9. מעבר דבורים

האבקה זרה תלויה במעבר הדבורים בין הזנים המפריים לזן המופרה. הדבורים נוהגות ב"חסכנות" אנרגטית. כתוצאה מכך, מעבר הדבורים בין השורות הינו בשיעור קטן ביותר. יחד עם זאת, ניתן למצוא הבדלים בשיעור המעברים בין שורות של זנים שונים המובילים לשיעורי האבקה שונה ביניהם. מספר המעברים נמדד ע"י בחינת מספר מעברים בדקה בין עץ משורה אחת לשורה המקבילה (גרף 5).

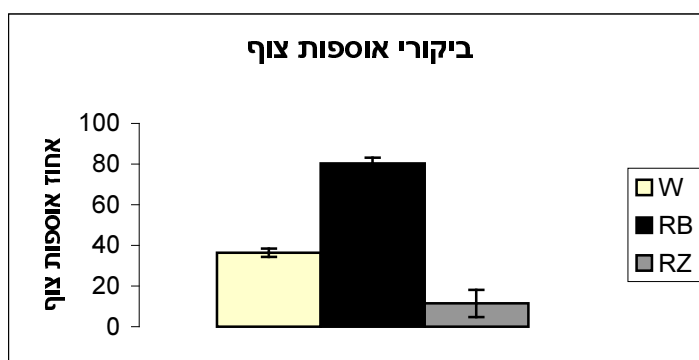


גרף 5 – מספר המעברים בין זן מפרה לזן המופרה RB. (N=9, קווי השגיאה - SE)

שיעור מעברי הדבורים בין שורות המפרים 'Royal Zee' 'Wickson' הינו נמוך ודומה (בסביבות דבורה/דקה/עץ), כך שניתן להניח כי קיימת רמה דומה של העברת אבקה מהם אל 'Red Beaut'.

10. אפיון פעילות הדבורים

דבורת הדבש אוספת צוף ואבקת פרחים כמרכיבי אנרגיה ומזון. תכונת ה"נאמנות" (Constancy) מתבטאת באיסוף סוג אחד של תגמול בכל שיחור כאשר, האפקטיביות להאבקה משתנה. אוספות אבקה נחשבות למאביקות טובות יותר עקב הימשכותן לפרחים בעלי אבקה טריה וחיונית. מתצפית אחר התנהגות הדבורה על הפרח, ניתן ללמוד אם היא אוספת צוף או אבקה, ומתוך כך לקבל אינדיקציה לגבי יעילות ההאבקה של הדבורים בזנים השונים. בגרף 6 מתואר היחס בין אוספות הצוף לאוספות האבקה בכל אחד מהזנים בשנת 2002.

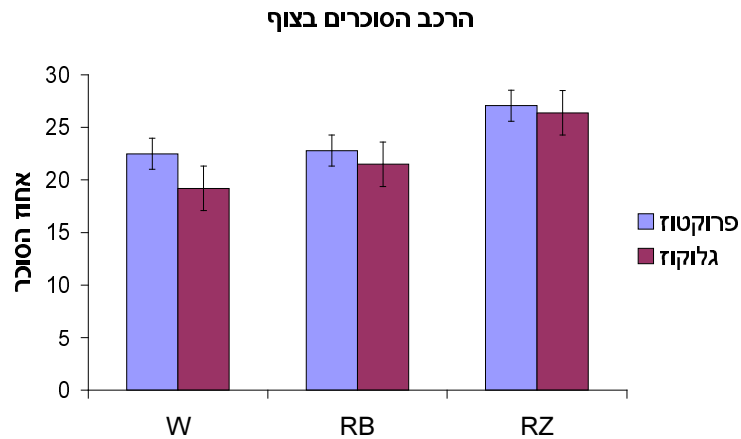


גרף 6 – אחוז אוספות הצוף מכלל הדבורים אשר ביקרו בזנים השונים שנת 2002.

מהגרף ניתן לראות כי שיעור אוספות הצוף ב 'Red Beaut' הינו גבוה ביותר. מהתצפית גם עלה כי הדבורים אוספות האבקה בזן היו ללא צמידות (ניסו לאסוף אבקה ולא הצליחו), כלומר אבקת 'Red Beaut', לא משכה את הדבורים או שמשכה אותן אך לא ניתן היה לאוספה כצמידות. ממצא זה מחזק ומסביר את שיעור אוספות הצוף הגבוה ב 'Red Beaut'. בזן 'Wickson' נצפו יותר מפי 3 אוספות צוף מאשר ב 'Royal Zee' (36 מול 11, בהתאמה).

11. הרכב הצוף

הרכב הסוכרים בצוף, המורכב בעיקר משלושת הסוכרים סוכרוז, פרוקטוז וגלוקוז, מהווה פקטור חשוב במשיכת הדבורים. הבדלים בהרכב הסוכרים יכולים להסביר הבדלים במשיכת הדבורים לפרח (גרף 7).

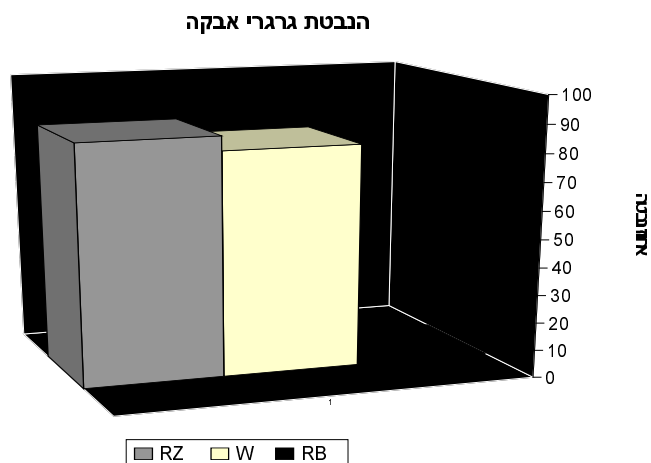


גרף 7 – אחוז הסוכר המרכיב את הצוף של כל אחד מהזנים כפי שנמדד ב HPLC. (SE ±)

הנתון הבולט מתוך ניסוי זה הוא החוסר בסוכרוז בצוף של שלושת הזנים. מעבר לחוסר זה, אין הבדלים מובהקים בריכוזי הסוכרים פרוקטוז וגלוקוז.

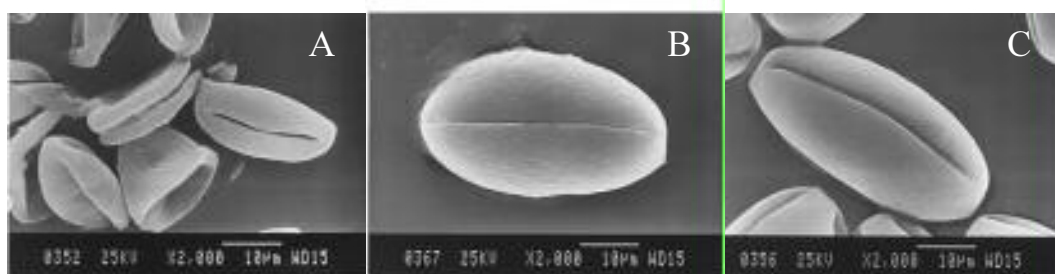
12. איכות האבקה

מאחר ואוספות האבקה נמשכות לפרחים בעלי אבקה חיונית בלבד, הן נחשבות גם כמאביקות טובות יותר. במטרה להבין את הפער הגדול באיסוף האבקה בין 'Red Beaut' למפרי, נבחנה חיוניות האבקה של כל זן ע"י הנבטת האבקה בתמיסת הנבטה (10% סוכרוז) (גרף 8).



גרף 8 – אחוז הנביטה של גרגרי אבקה לאחר הדגרה לשעה בתמיסת הנבטה (10% סוכרוז).

תוצאות ניסוי זה מראות כי אחוזי הנביטה של אבקת 'Wickson' ו'Royal Zee' גבוהים מאוד (כ- 80% בכל אחד), ואילו אבקת הזן 'Red Beaut' לא נבטה כלל. בנסיון לאתר הבדלים מורפולוגיים בין גרגרי האבקה של שלושת הזנים ביצענו צילום במיקרוסקופ אלקטרוני סורק (תמונה 6).



תמונה 6 – תמונות מיקרוסקופ אלקטרוני סורק של גרגרי אבקה 'Red Beaut' (A), 'Royal Zee' (B), 'Wickson' (C).

תמונות הצילום המיקרוסקופ האלקטרוני מראות באופן ברור את ההבדלים בין האבקה של 'Royal Zee' ו'Wickson' לעומת האבקה של 'Red Beaut'. בעוד גרגרי האבקה של המפרים הינם עגולים ותפוחים נראים גרגרי האבקה של 'Red Beaut' קטנים יותר ומצומקים. הבדלים אלו משפיעים באופן ישיר על התנהגות הדבורים על כל אחד מהזנים (ראה דיון).

13. הכפלת מספר הכוורות או הצבתן בדירוג

נערך ניסוי ראשוני על מטע אחד בלבד בכפר בלום (ראה חומרים ושיטות). נמצא כי אחוזי החנטה בטיפולים הצפוף והמדורג היו גבוהים באופן ניכר ומובהק בהשוואה לביקורת – 8.5, 14.1, 15.8 (טבלה 2). כתוצאה משיעורי החנטה הגבוהים, בטיפולי הצפוף והמדורג, בוצע בתחילת מאי דילול ידני מסיבי, בו הוסרו כ-25% מהפירות. למרות זאת, היבול שהתקבל בשני טיפולים אלה היה גבוה יותר באופן מובהק, וכמות הפרי הגדול לא היתה קטנה יותר למרות העומס.

טבלה 2: ההשפעה של הכפלת מספר הכוורות (2:1 לעומת 4:1) או הצבתן בדירוג (8:1 + 8:1 = 4:1) על אחוזי החנטה וגובה היבול במטע שזיף מזן בלק-דאימונד, כפר בלום 2003.

יבול (ק"ג/עץ)		חנטה (%)	טיפול
פרי גדול (<55 מ"מ)	כללי		
48 a	64.2 b	8.5 b	ביקורת
57 a	83.1 a	15.8 a	צפוף
52 a	84.3 a	14.1 a	מדורג

תוצאות באותו הטר, המלוות באותיות שונות, נבדלות זו מזו באופן מובהק, $P=0.05$.

דיון ומסקנות

עבודה זו, שמטרתה מציאת הגורמים לפוריות הנמוכה של זן השזיף 'Red Beaut', נחלקה לשני תחומים עיקריים. הראשון, הפן המולקולרי-גנטי הקשור בתהליך ההפריה על פי מנגנון אי ההתאם העצמי הגמטופיטי והשני, הפן האקולוגי, העוסק בתהליכי ההאבקה – משמע זרימת האבקה במטע התלויה ברובה בפעילות דבורת הדבש.

1. בידוד ואפיון אללים של S-RNase בשזיף היפני

במשפחת הוורדיים, לה שייך השזיף היפני, קיים מנגנון אי התאם עצמי גמטופיטי המונע הפרייה עצמית. מנגנון זה מאפשר את הגברת השונות הגנטית של המין, וכתוצאה תורם ליתרון אבולוציוני לצמח. מנגנוני אי התאם קיימים בכמחצית ממשפחות הצמחים בצורות שונות, דבר אשר נצפה כבר ע"י דרווין. מנגנון אי ההתאם העצמי הגמטופיטי מבוסס על לוקוס פולימורפי אחד (S-locus) בו מתפקדים מספר גנים אשר חלקם טרם זוהו. הגן ל RNase (S-RNase) הינו הטרו-אללי ונמצא בתאחיזה גנטית ללוקוס S. משום כך הוא משמש, מעבר לפעילותו במנגנון, גם כסמן להפלוטיפיות של הלוקוס S. כולו. לפני פענוחו של מנגנון אי ההתאם העצמי הגמטופיטי ברמה המולקולרית, בוצעו ניסויי ההתאמה בין זנים מבחינת ההפריה בשיטת הניסוי והטעייה. כל זן חדש, ניטע בחלקות ניסוי, זנים אחרים אשר ניטעו בסמוך שימשו להפרייתו, ונבחנה מידת יכולתם להפרות את הזן הנבדק על פי רמת החנטה והיבול שלו. ניסויים נוספים שהתבצעו במקביל היו האבקה ידנית של זן מסוים באבקת זן אחר. כל ניסוי כזה נמשך מספר עונות/שנים. לעומת זאת, בשיטה המוצעת קימת יכולת לאבחן את מידת ההתאמה בין זנים מפרים למופרים על פי אפיון מולקולרי של האללים. כמו כן היא יכולה להתבצע בפרק זמן קצר בהרבה.

אי התאם חלקי אינו גורם בהכרח לפחיתה ביבולים כיוון שגורמים רבים נוספים פועלים במטע, כדוגמת יכולת נשיאת הפרי של העץ, יעילות החנטה, מזג אוויר ופעילות הדבורים. יחד עם זאת זוהו מיקרים בהם התאמה אללית חלקית היוותה את הגורם לפחיתה ביבולים, כמו למשל במקרה דומה בתפוח שבו היתה פחיתה ביבולי הזן 'Top Red' כתוצאה מהפריה על ידי זן תואם חלקי, 'Jonathan'.

גם בשזיף שורות 'Red Beaut' הסמוכות לזן 'Royal Zee' חנטו והניבו פחות, מאשר שורות הסמוכות לזן 'Wickson'. לשם ברור האם ניתן להסביר את היבול הנמוך של 'Red Beaut' בשורות הסמוכות ל 'Royal Zee' בהתאם גנטי חלקי, הוחלט לאפיין את אללי ה-S בשלושת הזנים הנ"ל. הגן ל S-RNase, כולל חמישה אזורים שמורים המעורבים בייצוב החלבון ופעילות האנזימטית שלו, ואזור משתנה האחראי כנראה, על הספציפיות בפעילותו (בתוך אזור זה קיים אינטרון באורך משתנה לכל אלל). ע"י PCR עם "פריימרים אוניברסליים" הומולוגיים לאזורים השמורים של הגן, בודדו חמישה אללים שונים משלוש הזנים. בזן 'Wickson' זוהו האללים S3 ו S6, בזן 'Royal Zee' זוהו האללים S4 ו S5, ובזן 'Red Beaut' זוהו אלל אחד אשר סומן כ-S1. האללים רוצפו ונמצא כי ארבעת הראשונים הינם אללים שטרם רוצפו, ואילו S1 זהה לאלל Sa שזוהה בזן 'Surdum'. למרות העובדה שזוהו רק חמישה אללים (ולא שישה), נתונים אלה מספיקים כדי

לקבוע כי בזן 'Red Beaut' לא נמצא אף אחד מן האללים הקיימים בזנים 'Wickson' ו 'Royal Zee' (S3-S6), ומכאן שבעיית החנטה והיבול אינן נובעות מאי התאמה גנטית. חיזוק נוסף לממצאים אלה התקבל מתוצאות החנטה לאחר האבקה ידנית (האבקה בעודף) שבהם שיעור החנטה של 'Red Beaut' היה גבוה יותר בעקבות האבקה עם אבקת 'Royal Zee' מאשר עם אבקת 'Wickson' (גרף 3).

2. ניסיונות לאפיון אלל שני בזן 'Red Beaut'

אפיון אלל אחד בלבד ב 'Red Beaut' מהווה מגבלה בהתאמה של מפרים נוספים עבורו. משום כך נערכו ניסיונות לאפיון האלל, בתחילה ע"י ריאקציות PCR עם פריימרים שונים, המותאמים לכל האזורים השמורים באלל. לאחר שבכל המקרים התקבל תוצר אחד בלבד, הועלתה ההשערה כי בזן 'Red Beaut' קיימים שני אללים אשר אינם נבדלים בגודלם, או אשר גודלם כמעט זהה ואינו מאובחן בהרצה בגיל. כדי לענות על שאלה זאת נוסו שתי גישות: האחת, סריקה של מספר רב של מושבות חיידקים טרנספורמנטיות, נושאות תוצרי ליגציה עם תוצר PCR אשר בכולם נמצא האלל S1. השניה, שימוש במכשיר DHPLC. באמצעות מכשיר זה ניתן לזהות הבדלים ברמה של נוקלאוטיד אחד בודד בין שני רצפים נתונים. מהרצה במכשיר, התברר כי תוצרי ה PCR שנתקבלו מהפריימרים האוניברסליים מול DNA גנומי של 'Red Beaut' אינו מכיל תערובת אללים אלא אחד בודד – S1. אינדיקציה נוספת להמצאותו של S1 בלבד בזן 'Red Beaut' נתקבלה בעקבות בדיקת האללים בזרעי הפירות אשר נוצרו כתוצאה מהאבקה חופשית. מאחר וצפויה התפלגות שווה בין שני האללים האימהיים (S1 הידוע והאלל אחר) היינו אמורים לקבל את האלל S1 במחצית מהצאצאים. למרות זאת, נמצא כי כל 32 הצאצאים שנבדקו היו בעלי האלל S1. אי לכך, ובהתאם לניסויים הנ"ל נראה 'Red Beaut' נושא רק את האלל S1.

S1 עשוי להיות במצב הומוזיגוטי או כאלל יחיד מול חסר. הומוזיגוטיות היא תופעה נדירה מאוד, בצמחים בעלי אי התאם עצמי, ומתרחשת רק לאחר שבירת מנגנון אי ההתאם, והתרחשות הפריה עצמית או הפריה עם גרגר אבקה נושא הפלוטיפי זהה לאלל S של הביצית המופרית. חסר של אלל שלם, נצפה ע"י Ushijima *et al.* (2001), בשקד (*Prunus dulcis*). מוטציית החסר, לוותה בהכפלתו של האלל השני ליצירת הומוזיגוט. באם התרחש רק החסר ללא הכפלה, יכול הדבר להוביל להפלת הביציות הנושאות חסר זה, כך שהדבר לא ימצא בבדיקת האללים בצאצאים. אפשרויות המסבירות מצב הטרזיגוטי, למרות הממצאים שהובאו אפשריות, אך הן דורשות הנחות קשות וסבירותן נמוכה.

3. התאמת אללי S בין זנים במטעי השזיף המסחריים בישראל

למרות שבמקרה הנדון, הפחיתה בחנטה וביבולים לא נקשרה למנגנון אי ההתאם, עדיין יתכנו מקרים בשזיף, כפי שצויין לעיל, לגבי תפוח, וכפי שנמצא לאחרונה באגס (ענת זיסוביץ במסגרת עבודת המאסטר במעבדה) שבהם אי התאם אללי יהיה הגורם לפחיתה ביבול. הממצאים לגבי האללים שבודדו בעבודה זו יושמו בעקבות פנייה משה"מ לאבחון התאמה בין 'Royal Zee' ומפרים פוטנציאליים. המפרים הפוטנציאליים הינם שלושה זנים הפורחים במקביל ל -

'Royal Zee' ומהווים, יחד איתו, את הזנים החדשים המובילים בארץ. במטעים חדשים יש מגמה לטעת את ארבעת הזנים הללו כמפרים זה לזה. מאחר שזוהו שני האללים של 'Royal Zee' (S4 ו S5) היה ניתן לבצע ריאקציית PCR ספציפית לזיהוי אללים אלו במפרים הפוטנציאליים. מאנליזה ה PCR עלה כי 'Angeleno' ו 'Black-Diamond' נושאים אלל משותף עם 'Royal Zee', בעוד הזן השלישי 'Black-Gam' נמצא ללא אללים משותפים (טבלה 1). מכאן, כי המפרה בעל ההתאמה המלאה ל 'Royal Zee' הינו 'Black-Gam' ומטעים שנטעו בשילובים האחרים עלולים להניב יכול מופחת כתוצאה מהתאם חלקי.

4. חפיפת פריחה

מנגנון אי ההתאם העצמי הגמטופיטי יוצר תלות בהאבקה זרה. חנטה ויבול נמוך יכולים לנבוע, איפוא, גם מבעיות של זרימת אבקה במטע, כלומר, מבעיות הקשורות בהעברת האבקה מהזנים המפרים לזן המופרה. הפרמטר הדומיננטי בהקשר זה הינו חפיפת הפריחה בין הזנים. חפיפת הפריחה הינה למעשה המדד לתאום הבשלת הגמטות הזכריות (הנמצאות בגרגרי האבקה) והגמטות הנקביות (בתוך הביציות). שלוש עונות המעקב (שתי עונות המחקר (2001 + 2002) והעונה שקדמה (2000)) הצביעו על מגמה ברורה של חפיפה כמעט מושלמת בין פריחת 'Royal Zee' ו 'Red Beaut' לעומת חפיפה לא עקבית בין הזן 'Wickson' ל'Red Beaut'. בשנת 2000 היתה חפיפה טובה, ב 2001 גרועה וב 2002 בינונית. הממצאים הראו יחס ישר בין אחוזי החנטה לחפיפת הפריחה. המסקנה איפוא היא כי התלות בחפיפת הפריחה הינה קריטית לשם קבלת יבול מקסימלי. כיוון ש'Wickson' נוטה באופן טבעי לפרוח לאחר 'Red Beaut' נהוג לרססו בחומרים מקדימי פריחה. תוצאות המעקב שלנו הראו את חשיבות הטיפול הנכון בגורם זה.

5. אטרקטיביות הזן 'Red Beaut' לדבורים

העברת אבקה, מבוצעת בשזיפים בעיקר ע"י דבורת דבש ומעט חרקים שונים. על מנת להבטיח רמות האבקה גבוהות מוכנסות למטעים מסחריים כוורות של דבורת דבש. משום כך, יש הכרח בבחינת פעילותם של הדבורים במטע בזנים השונים. הבדיקה שערכנו, לבחינת אטרקטיביות הזנים השונים לדבורים (גרף 4), העלתה כי הזן 'Red Beaut' אינו אטרקטיבי, ורמת פעילות הדבורים עליו היא נמוכה ביותר. למעשה, מספר ביקורי הדבורים ב'Red Beaut' הנו כה נמוך (9 לעומת כ - 20 הדרושים להפרייה יעילה), ויכול להסביר את בעיות החנטה והיבול בזן. מברור הסיבות היכולות להוביל לחוסר אטרקטיביות זה, התגלה 'Red Beaut' כזן עקר זכרית. העקריות הזכרית של 'Red Beaut' מתבטאת בצורתם האבורטית של גרגרי האבקה (תמונה 6) ובחוסר כושר נביטה (חוסר חיוניות) המתבטא, ככל הנראה גם בחוסר במרכיבי מזון החיוניים לדבורים. שני גורמים אלו, הינם ההסברים השכיחים לאי משיכת דבורים אוספות אבקה. יש הטוענים (איזיקוביץ מידע בע"פ) כי הצורה הא-רגולרית של גרגר האבקה מונעת מהדבורה את היכולת לאוספו לצמידה. יתכן גם, כי חוסר במרכיבי מזון מלווה בחוסר במרכיבי ריח וטעם המושכים את הדבורים לאבקה. כך או כך, זנים חסרי אבקה, פחות אטרקטיביים לדבורים מזנים בעלי אבקה. אינדיקציה נוספת לכך שיש מחסור בפעילות דבורים על הזן 'Red Beaut' אפשר להסיק מפילוח אחוזי החנטה בכל שורה לפי הצד הפונה למפרה לעומת הצד הנגדי לו. גרף ב'2 מצגי נתונים אלו,

ואפשר לראות כי תמיד בצד הפונה למפרה יש כ – 50% יותר חנטה מן הצד הנגדי. תמונה כזאת הינה ביטוי קלאסי של מחסור בדבורים במטע, במקרה זה על הזן 'Red Beaut'. (Filmer (1941), מציע כי העלאת מספר הכוורות במטע תגרום להעלאת הביקורים גם בזנים פחות אטרקטיביים, ככל הנראה עקב הגדלת התחרות על מקורות מזון.

6. הגמול האנרגטי לדבורים

הדבורים באות לפרח על מנת לקבל גמול בצורת צוף ואבקה. במהלך האבולוציה צמחים עברו שינויים על מנת למשוך חרקים מאביקים הן בתחום הפרסום (צבע הפרח, גודלו וצורתו, ריחות וכו') והן באיכותו של הגמול, בכדי לעודד ביקורים חוזרים של מאביקים. מרכיבי הצוף והאבקה עשויים, להשפיע ישירות על מידת האטרקטיביות של הזנים, ועל השוני באופי פעילות הדבורים (אוספות צוף או אבקה). בחינת הרכב שלושת הסוכרים העיקריים בצוף, מראה כי בשלושת הזנים הוא מכיל את החד סוכרים גלוקוז ופרוקטוז, ללא המצאות סוכרוז. הנסיון לקשור, את הרכב הסוכרים עם מידת האטרקטיביות של הפרח לדבורים אוספות צוף לא הביא לתוצאות חד משמעיות. מול הטענה כי אוספות הצוף נמשכות לצוף עשיר בסוכרוז (DeGrandi-Hoffman, 1987) מצא wykes (1952) כי הרכב אחיד של שלושת הסוכרים הינו בעל המשיכה הגבוהה ביותר. ככל הנראה מספר גורמים, ולא רק אחוז או כמות הסוכרים, יקבעו את מידת האטרקטיביות, ומרכיבים לא סוכריים יכולים גם הם להוות פקטור בדחייה או משיכה של אוספות צוף (Southwick et al., 1981). בכל מקרה, הכמות הקטנה של הפרשת הצוף בשזיף ויתכן כי המחסור הספציפי בסוכרוז גורמים לאטרקטיביות הנמוכה של אוספות הצוף בשזיף. דבורים אוספות אבקה, נמשכות לפרחים בעלי אבקה טרייה וחיונית. על מנת לבחון את חיוניות גרגרי האבקה של שלושת הזנים, הונבטו גרגרי אבקה בתמיסת הנבטה. תוצאות הנבטה זאת נתנו תמונה חד משמעית, של אחוזי נביטה גבוהים מאוד בזנים 'Wickson' ו 'Royal Zee' (כ – 80%) לעומת 0% נביטה בזן 'Red Beaut' (גרף 8). חוסר הנביטה של אבקת 'Red Beaut' נובעת, כאמור לעיל, מהעקרות הזכרית בזן. עובדה זאת גורמת, מעבר לירידה הדרסטית בפעילות ב 'Red Beaut' לעומת שני הזנים המפריים (9 ביקורים לדקה לעומת 19), להיותו מואבק ע"י דבורים אוספות צוף בלבד.

7. הבדלים בפעילות דבורים בין 'Wickson' ל 'Royal Zee'

מאחר והתצפיות הראשוניות, אשר נתמכו גם בנתונים שנאספו במחקר זה, נראה כי שורות 'Red Beaut' הסמוכות למפרה 'Wickson' חונטות ומניבות יכולים גבוהים יותר משורות 'Red Beaut' הסמוכות למפרה 'Royal Zee', ולאור העובדה כי הגורם אינו התאמה אללית בין מפרה למופרה, נבחנה האפשרות כי פעילות דבורים שונה בין שני הזנים המפריים הינה הגורם להבדל זה. יש לזכור כי פעילות הדבורים לאיסוף הצוף והאבקה, לא מבוצעת על מנת להאביק את הפרחים, אלא כדי לאסוף חומרי מזון לכוורת. הדבורים נחלקות כאמור, לאוספות צוף ואוספות אבקה. אוספות האבקה נחשבות כמאביקות טובות יותר, מאחר והן נמשכות לפרחים בהן האבקה חיונית, לעומת אוספות הצוף הנמשכות לפרחים בעלי צוף אשר יכולים להיות ללא אבקה, או בעלי אבקה לא חיונית. בחלק מפרחי משפחת הוורדיים, כדוגמת התפוח, ידועה תופעה של איסוף צוף

מצד הפרח ('Side-workers') ללא נגיעה באבקנים, תופעה המפחיתה עוד יותר את יעילות ההאבקה של הדבורים. פרחי השזיף הינם קטנים יותר ולכן לא מתאפשרת "גניבת" צוף כזאת, וכל הדבורים במטע, הן אוספות הצוף וכמובן אוספות האבקה, נחשבות כ' Top-workers' וכל ביקור שלהן בפרח מלווה בנגיעה באבקנים החיונית להעברת האבקה. כדי ללמוד על זרימת האבקה בין המפרים השונים לזן המופרה נבחנו האטרקטיביות של המפרים לדבורים, חיוניות האבקה, מעבר הדבורים מהמפרים ל' Red Beaut', הרכב הצוף וחלוקת הדבורים הפועלות על המפרים לאוספות צוף ואוספות אבקה. בצילומי מיקרוסקופ אלקטרוני סורק נמצאו גרגרי האבקה של 'Wickson' ו' Royal Zee' תקינים. בחינת האטרקטיביות של שני הזנים המפרים לדבורים (גרף 4) הראתה כי הפעילות בזנים אלו היא תקינה וכי אין הבדל בפרמטר זה בין הזנים. בכל אחד מהזנים נצפו כ- 19 ביקורים לדקה, המהווים כמות טובה להתרחשות הפריה יעילה.

פעילות הדבורים מאופיינת ב"היצמדות" למקום קטן ככל האפשר בו מצאו מזון ללא בזבז אנרגיה מיותר. תכונה זאת, גורמת לתנועת דבורים מוגבלת, בעיקר לאותו עץ. מאחר והמטעים מעוצבים בדרך כלל בשורות שבהן משורגים ענפי העצים אלה באלה, תנועת הדבורים לאורך השורה (מעץ אחד לעץ השכן) דומה מאוד לתנועה בתוך העץ. לא כך הדבר כאשר מדובר על המעבר בין השורות. מעבר זה הנחוץ לביצוע האבקה זרה, מתרחש בשעור קטן בהרבה מהמעברים לאורך השורה. בדיקת מספר המעברים מכל זן מפרה אל 'Red Beaut' בא לבדוק האם קיים הבדל בתנועה של הדבורים מ' Wickson' אל 'Red Beaut' לעומת מ' Royal Zee' אל 'Red Beaut'. התוצאות (גרף 5) מראות כי מספר המעברים מן הזנים המפרים ל' Red Beaut' נמוך מאוד, ככל הנראה משום האטרקטיביות הנמוכה של 'Red Beaut', וכי אין הבדל בין המפרים בנושא זה.

הרכב הצוף, כפי שזכר לעיל, והכמויות הקטנות של הצוף מביאים לידי כך, שבדרך כלל רוב הדבורים במטעי השזיף אוספות אבקה. בדיקה של היחס בין אוספות הצוף לאוספות האבקה בזני הניסוי, העלתה התנהגות דבורים חריגה ביותר בזן 'Red Beaut' כ- 80% מכלל הדבורים אשר ביקרו בו אספו צוף (גרף 6). למעשה גם שאר הדבורים אשר נצפו "לכאורה" כאוספות אבקה, היו ללא צמידות, כתוצאה מניסיון לא מוצלח לאסוף אבקה. מצב זה גורם לדבורה לעזוב את המקום בו לא הצליחה לאסוף אבקה ולתור מקום אחר. מכאן ש' Red Beaut' מואבק כמעט בלעדית ע"י אוספות צוף. מאחר, ובזן 'Wickson' אחוז הדבורים אוספות הצוף גבוה פי שלושה מאשר בזן 'Royal Zee' (36% לעומת 11% בהתאמה), סביר כי מבין הדבורים העוברות בין השורות, אלה המגיעות מ' Wickson' מאביקות את פרחי 'Red Beaut' בשיעור גבוה יותר מאשר אלה המגיעות מ' Royal Zee'. כתוצאה מכך היבולים של 'Red Beaut' בשורות הסמוכות ל' Wickson' גבוהים מאלה שבשורות הסמוכות ל' Royal Zee'.

מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר

1. השזיף היפני השייך למשפחת הוורדיים ונושא את מנגנון אי ההתאם העצמי הגמטופיטי. ככל צמח בעל מנגנון אי התאם עצמי, תלוי השזיף בהאבקה זרה מתאימה גנטית לשם חנטה. לא נמצאו אללים משותפים בין שני הזנים המפרים 'Wickson' ו'Royal Zee' והזן המופרה 'Red Beaut', ולכן אין אפשרות לייחס את אחוזי החנטה והיבול הנמוכים בזן זה, להתאם חלקי עם אחד המפרים. במודל המחקר נמצא כי הזן המופרה 'Red Beaut', הינו עקר זכרית וגרגרי האבקה האבורטיים שלו, אינם ברי-איסוף על ידי דבורים אוספות אבקה. מכאן שהוא מואבק באופן כמעט בלעדי על ידי דבורים אוספות צוף. מאחר ונצפתה פעילות גדולה יותר של אוספות צוף בזן 'Wickson' לעומת 'Royal Zee', ולאור העובדה כי אוספות הצוף הינן המאביק העיקרי בזן 'Red Beaut', קיים יתרון משמעותי ל'Wickson' כמאביק ל'Red Beaut'. לסיכום, נראה כי בחינת אחוזי החנטה ורמת היבול צריכה לכלול בזן 'Red Beaut', מעבר להתאמת מפרים לפי מנגנון אי ההתאם העצמי, גם בחינת המפרים על פי יכולתם למשוך דבורים אוספות צוף. כמו כן יש לשקול פתרונות האבקה חלופיים, כמו נטיעת מפרה בתוך שורת ה'Red Beaut', הרכבת ענף מזן שונה בתוך העץ, העלאת מספר הכוורות במטע והטיית הדבורים לאיסוף צוף במטע.
2. למרות שבמודל המחקר נמצא כי אין בעיה של התאמה גנטית בין שלושת הזנים הנ"ל שנבדקו, מצאנו כי בזני שזיף אחרים יש בעיה של התאם גנטי. לאור זאת יש צורך לאפיין את האללים של הגן לאי התאם עצמי בכל זני השזיף הקיימים היום במטעים.
3. לאור התוצאות הראשוניות והחיוביות על הגדלת היבולים לאחר הכפלת מספר הכוורות במטע או הצבתן בדירוג, יש להמשיך בכיוון מחקר זה ולהרחיבו לזנים נוספים ולמטעים שונים.
4. לזן RB אבקה מנוונת ובלתי חיונית, ולכן איננו יכול לשמש כמאביק של זני שזיף אחרים.

שאלות סיכום

מטרות המחקר לתקופת הדוח תוך התייחסות לתכנית העבודה.

העלאת יבול בשזיף היפני ע"י:

- פיתוח טכניקת עבודה לאנליזה של אללי S באמצעות PCR.
- אפיון אללי S של שישה זני שזיף ברמה המולקולרית, לבחינת ההתאמה הגנטית ביניהם.
- קביעת פוטנציאל הזנים (W) Wickson ו-(RZ) Royal Zee כמפריס עבור הזן האמהי Red Beaut (RB) לאחר ההאבקה הטבעית במטע.
- הגברת פעילות הדבורים במטע ע"י הכפלת מספר הכוורות או הצבתן בדירוג.

עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדוח.

- בבדיקת יעילות המפריס של RB לאחר האבקה טבעית במטע. נמצא כי:
 - א. הזן המפרה W הינו יעיל יותר מהזן המפרה RZ. נתן חנטה ויבול גבוהים יותר.
 - ב. בצד הפונה למפרה (בשורת ה-RB) היה אחוז החנטה גבוה באופן משמעותי ומובהק מהצד הנגדי למפרה. תוצאה זו נראתה בסמיכות לשני הזנים המפריס, ומכאן עולות שתי מסקנות:
 1. חשיבות גדולה של מפריס עבור הזן RB.
 2. חשיבות גדולה להתנהגות הדבורים כווקטור להעברת אבקה.
- הכפלת מספר הכוורות במטע או הצבתן בדירוג העלתה את שיעורי החנטה וגובה היבול.
- אפיון אללי S של ששת זני השזיף. זוהו כל האללים (ל-RB אלל אחד בלבד), ונמצא שיש התאם גנטי מלא בין כ"א מהמפריס (RZ או W) לבין RB. עם זאת, בזנים נוספים שנבדקו (בלק-דאימונד, בלק-ג'ים ואנג'לינו) נמצא כי יש בעיה של אי התאם גנטי חלקי בינם לבין עצמם, ובינם לבין RZ.
- לזן RB גרגרי אבקה מנוונים ולא חיוניים ולכן: א). הוא לא יכול לשמש כמפרה לזנים אחרים. ב). הדבורים שמבקרות אותו לא אוספות אבקה אלא צוף, ומכאן שהאבקה ה-RB מתבצעת ע"י אוספות צוף בלבד.
- הזן W מושך "אוספות צוף" פי 3 מהזן RZ, ולכן פוטנציאל ההאבקה שלו (ל-RB) גבוה יותר מזה של ה-RZ.

המסקנות וההשלכות לגבי יישום המחקר.

נמצא שהסיבה להבדלים בין שני המפריס של RB אינה נובעת מאי התאם גנטי, אלא מהתנהגות דבורים שונה על פרחי שלושת הזנים. הפעילות השונה של הדבורים כמאביקות מושפעת מאבקה בלתי חיונית על פרחי ה-RB (שכתוצאה ממנה מתבצעת ההאבקה רק ע"י אוספות צוף) ומכוסר משיכה גבוה של דבורים אוספות צוף לפרחי ה-W בהשוואה לפרחי ה-

RZ. הכפלת מספר הכוורות או הצבתן בדירוג יכולה לשפר מאוד את ההאבקה הזרה ולהעלות יבולים. בזנים נוספים שנבדקו נמצא שיש בעיה של אי התאם גנטי בין זני שזיף שונים.

הבעיות שנתרו לפתרון.

- לבחון את פוטנציאל ההפריה של הזנים השונים (אחד על אחד) ע"י האבקות ידניות וע"י בדיקות התאמה גנטית.
- לבחון את נושא הכפלת מספר הכוורות והצבתן בדירוג במטעים נוספים, באזורים שונים ובהרכב זנים שונה.
- לברר את הסיבה לאטרקטיביות השונה של הדבורים לזנים השונים במטע.
- להרחיב את בדיקת נושא ההתאמה הגנטית לכל הזנים המסחריים שקיימים במטעים.

האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדוח?

הידע מופץ בכתיבת הדו"ח למדען הראשי ולמגדלים, בימי עיון (16/12/03) וב"מועדוני מגדלים" שמתקיימים עבור המגדלים במהלך חורף זה, ובמאמרים שנכתבו בעיתונות המקצועית (ראה סעיף "רשימת פרסומים" בתחילת הדו"ח).

פרסום הדו"ח.

אני ממליץ לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה (בספרות ובאינטרנט).